



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

⑯ EP 0 691 983 B 1

⑯ DE 694 27 690 T 2

⑯ Int. Cl. 7:
C 07 K 1/26
B 01 D 57/02

⑯ Deutsches Aktenzeichen:	694 27 690.1
⑯ PCT-Aktenzeichen:	PCT/AU94/00172
⑯ Europäisches Aktenzeichen:	94 911 787.3
⑯ PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 94/22904
⑯ PCT-Anmeldetag:	7. 4. 1994
⑯ Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	13. 10. 1994
⑯ Erstveröffentlichung durch das EPA:	17. 1. 1996
⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	11. 7. 2001
⑯ Veröffentlichungstag im Patentblatt:	2. 5. 2002

⑯ Unionspriorität: PL822193 07. 04. 1993 AU PL828593 15. 04. 1993 AU	⑯ Erfinder: MARGOLIS, Joel, Greenwich, AU
⑯ Patentinhaber: Gradipore Ltd., Frenchs Forest, Neusüdwales/New South Wales, AU	
⑯ Vertreter: Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col., 50667 Köln	
⑯ Benannte Vertragstaaten: CH, DE, FR, GB, IT, LI	

⑯ VERBESSERUNGEN IM AUFTRENNEN VON PROTEINEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 694 27 690 T 2

DE 694 27 690 T 2

Hi/Dt

Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur vorbereitenden Elektrophorese und insbesondere derartige Verfahren und Vorrichtungen, die zu einer in großem Umfang vorgenommenen Rückgewinnung von Makromolekülen wie z.B. Proteinen verwendbar sind.

10 Beschreibung des Standes der Technik

Die elektrophoretische Abscheidung von Makromolekülen wie z.B. Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren und anderen Komponenten wird typischerweise unter Verwendung eines Mediums wie etwa eines chemischen Gels oder einer Membran ausgeführt. Bei der Durchführung des Vorgangs wird ein erster Puffer, der eine Mischung aus mehreren Makromolekül-Spezies enthält, in Kontakt mit dem elektrophoretischen Medium gebracht, während entlang dem Medium oder über das Medium hinweg ein elektrophoretisches Potenzial angelegt wird, so dass mindestens einige der Makromoleküle veranlasst werden, in das Medium zu wandern. Das Medium weist typischerweise eine Abscheidungs-Poren-Größe auf, die derart gewählt ist, dass der Eintritt von Molekülen erlaubt wird, deren Größe kleiner als eine gegebene Größe ist. Ferner kann die Handhabung des pH-Wertes der bei dem Abscheidungsvorgang verwendeten Puffer zu der Wahl der Molekül-Spezies beitragen, die abgeschieden werden soll. Die abgeschiedenen Moleküle werden normalerweise dazu veranlasst, aus dem Medium in einen zweiten Puffer einzutreten, in dem sie gesammelt werden.

Ein bekanntes Problem bei derartigen Verfahren zur elektrophoretischen Abscheidung besteht darin, dass Moleküle, die größer sind als eine gegebene Größe, die Oberfläche des elektrophoretischen Mediums zu beschmutzen.

Dieses Problem wurde durch eine Technik überwunden, bei der die Polarität des elektrophoretischen Potenzials ungekehrt wird, um die beschmutzenden Moleküle von der Oberfläche des Mediums wegzuziehen, jedoch zu gewährleisten, dass immer noch eine positive Bewegung der abzuscheidenden Moleküle 5 zu dem zweiten Puffer hin existiert. Um dies zu erzielen, wird die Polaritäts-Umkehr typischerweise nur in kurzen Stößen ausgeführt, und die Gesamtzeit der Polaritäts-Umkehr ist notwendigerweise eine Funktion der Zeit des Anlegens der "Vorwärts"-Polarität des elektrophoretischen Potenzials (siehe das Australische Patent 601040).

10

Typischerweise wird das Umkehren der Polarität wiederholt mit einer derartigen Rate durchgeführt, dass die Membran konstant von sämtlichem oberflächenverschmutzendem Material gereinigt wird. Es ist ersichtlich, dass der Vorgang des Umkehrens der Polarität eine Analogie zu der Vibrationsbewegung 15 eines Siebs darstellt. Gemäß dieser Modellvorstellung treten sämtliche Partikel mit Untergröße durch das Sieb hindurch, während Partikel mit Übergröße das Sieb zusetzen. Durch das Vibrieren des Siebs wird die Oberfläche des Siebs von den übergroßen Partikeln befreit, und es können mehr untergroße Partikel durch das Sieb hindurchtreten.

20

Ein Beispiel eines elektrophoretischen Abscheidungsvorgangs, bei dem eine Stromumkehrung zur Verhinderung eines Verschmutzens der Membran verwendet wird, ist in WO-A-8807406 aufgeführt.

25

Die bekannten elektrophoretischen Abscheidungsverfahren sind generell wirksam zum Abscheiden von unterschiedlichen Transporteigenschaften (z.B. Größe, Ladung, Form, isoelektrischer Punkt) aufweisenden Makromolekülen, die tatsächlich in das elektrophoretische Medium eingetreten sind. Wenn jedoch die Transporteigenschaften von zwei oder mehr Makromolekülen in dem Medium 30 ähnlich sind, kann es bei Verwendung derartiger herkömmlicher Verfahren schwierig sein, eine der makromolekularen Spezies in der Mischung von den anderen abzuscheiden.

Das Ausmaß, in dem zwei Molekül-Spezies in einem elektrophoretischen Medium physisch voneinander getrennt werden können, hängt nicht nur von ihren Ladeeigenschaften ab, sondern auch von der mittleren Länge der Wege, dem

5 die Moleküle durch das elektrophoretische Medium folgen können. Selbst bei einer sehr großen mittleren Weglänge kann möglicherweise keine vollständige Abscheidung der Molekül-Spezies erreicht werden, da Moleküle der sich schneller bewegenden Spezies in dem Medium eingeschlossen werden und die sich langsamer bewegende molekulare Spezies verschmutzen. Sogar falls ein

10 bloßes Verlängern des Mediums eine vollständige Abscheidung der beiden die ähnlichen Transporteigenschaften aufweisenden Spezies bewirken würde, wäre die Verwendung eines derartigen verlängerten elektrophoretischen Mediums unpraktisch, und es müssten eventuell praktische Probleme, z.B. Wärmeverlust, beseitigt werden.

15 EP-A-0395319 beschreibt einen Vorgang zur Abscheidung von Makromolekülen unter Verwendung einer periodischen Folge von Impulsen, und zielt speziell auf die elektrophoretische Abscheidung von DNA ab. Die Impulsabgabe führt eine mikroskopische Dehnung und Relaxation der Moleküle herbei und hat so

20 mit die größte Auswirkung auf große DNA-Fragmente.

US-A-3506554 beschreibt eine auf Feld-Umkehrung basierende Abscheidung.

Bei dem vorliegenden Verfahren und der vorliegenden Vorrichtung hingegen

25 wird die beobachtete Differenz in der Ausbreitungsrate der Komponenten, die sich bei Verwendung eines gewählten elektrophoretischen Mediums und/oder pH-Wertes des Puffers ergibt, dahingehend verwendet, dass unterschiedliche Spezies von Makromolekülen trotz Ähnlichkeiten ihrer Transporteigenschaften

30 in praktischer Weise sowie im wesentlichen vollständig voneinander abgeschieden werden können.

Überblick über die Erfindung

Die vorliegende Erfindung erstellt ein Verfahren zur elektrophoretischen Abscheidung mindestens einer Spezies von Makromolekülen aus einer Mixtur mit mindestens einer anderen Spezies von Makromolekülen durch Veranlassen einer elektrophoretischen Migration der mindestens einen Spezies von Makromolekülen aus einer ersten Elektrolytlösung zu einer zweiten Elektrolytlösung durch ein zwischen den Elektrolytlösungen angeordnetes elektrophoretisches Medium, wobei in dem Medium Durchgangswege ausgebildet sind, deren Querschnittsbemessung ein Hindurchtreten der mindestens zwei in der Mixtur befindlichen Spezies von Makromolekülen durch die Durchgangswege erlaubt und deren mittlere Weglänge eine Bewegung von Molekülen durch das Medium bewirkt, die relativ zu der in der Bewegungsrichtung mindestens einer der in der Mixtur befindlichen Spezies Makromoleküle gemessenen maximalen Be- messung sehr groß ist, mit den folgenden Schritten:

- (a) Anlegen eines elektrophoretischen Potenzials an das elektrophoretische Medium, mit einer Anfangs-Polarität, mittels derer die Makromoleküle der Mixtur in das Medium getrieben werden, bis ein Anteil der mindestens einen Spezies von Makromolekülen aus dem Medium in die zweite Elektrolytlösung austritt und die andere Spezies von Makromolekülen über eine wesentliche Strecke durch das Medium hindurch vorgedrungen ist, jedoch bevor die mindestens eine andere Spezies von Makromolekülen in der genannten Weise ausgetreten ist;
- (b) Umkehren der Polarität des elektrophoretischen Potenzials, so dass die in dem Medium befindlichen Makromoleküle zurück zu der ersten Elektrolytlösung hin getrieben werden, jedoch im wesentlichen verhindert wird, dass der Anteil der einen Spezies von Makromolekülen, der in die zweite Elektrolytlösung ausgetreten ist, zurück in das Medium gezogen wird; und
- (c) Wiederholen des Anlegens und Umkehrens des elektrophoretischen Potenzials, bis ein gewünschter Anteil der mindestens einen Spezies von Makromolekülen in die zweite Elektrolytlösung übertragen worden ist.

Vorzugsweise wird der Schritt des Umkehrens des elektrophoretischen Potenzials für eine Zeitdauer wiederholt, in der die andere Spezies von Makromolekülen im wesentlichen vollständig zurück in die erste Elektrolytlösung getrieben werden kann, bevor die Anfangs-Polarität des elektrophoretischen Potenzials wiederhergestellt wird und der Zyklus des Anlegens und Umkehrens der Polarität des elektrophoretischen Potenzials wiederholt wird.

5 Vorzugsweise wird der Anteil der einen Spezies von Makromolekülen, der in die Elektrolytlösung hinein ausgetreten ist, im wesentlichen daran gehindert, zurück in das Medium gezogen zu werden, indem vor dem Schritt des Umkehrens der Polarität des elektrophoretischen Potenzials selektiv die zweite Elektrolytlösung durch eine frische zweite Elektrolytlösung ersetzt wird.

10 Vorzugsweise wird der Anteil der mindestens einen Spezies von Makromolekülen, der in die zweite Elektrolytlösung hinein ausgetreten ist, während des Schritts des Anlegens der Anfangs-Polarität des elektrophoretischen Potenzials in ein erstes stromabwärts gelegenes Reservoir transportiert wird, und bei dem während des Schritts des Umkehrens der Polarität des elektrophoretischen Potenzials ein zweites stromabwärts gelegenes Reservoir die frische zweite Elektrolytlösung zuführt.

15 Vorzugsweise wird der Anteil der mindestens einen Spezies von Makromolekülen, der in die zweite Elektrolytlösung hinein ausgetreten ist, während des Schritts des Anlegens der Anfangs-Polarität des elektrophoretischen Potenzials in ein erstes stromabwärts gelegenes Reservoir transportiert wird, und bei dem während des Schritts des Umkehrens der Polarität des elektrophoretischen Potenzials ein zweites stromabwärts gelegenes Reservoir die frische zweite Elektrolytlösung zuführt.

20 Die Umkehr-Polarität des elektrophoretischen Potenzials wird vorzugsweise für eine Zeit aufrechterhalten, die mindestens gerade gleich der Zeit ist, für die die Anfangs-Polarität aufrechterhalten wird. Besonders bevorzugt beträgt das Zeitverhältnis zwischen der Anfangs- und der Umkehr-Polarität von 1:2 bis 1:4.

25 Die Elektrolyt-Lösungen sind vorzugsweise formatierte Puffer, um das elektrophoretische Medium auf einem gewünschten pH-Wert zu halten. Alternativ kann dies durch die Einbeziehung amphoterer Puffer-Zusammensetzungen in das elektrophoretische Medium erzielt werden.

Die mittlere Länge des Weges der Moleküle durch das elektrophoretische Medium ist vorzugsweise mindestens 10.000 mal und besonders bevorzugt mindestens 20.000 mal so lang wie die effektive Größe mindestens einer der Spezies von Makromolekülen in der Mixtur. Die effektive Größe der Makromoleküle ist die maximale Größe, gemessen in der Bewegungsrichtung der Makromoleküle des elektrophoretischen Mediums bei dem aufgebrachten Potenzial, das dazu dient, die Makromoleküle durch das Medium hindurch zu ziehen. Typischerweise ist die mittlere Weglänge, die selbstverständlich normalerweise etwas länger als die Dicke des elektrophoretischen Mediums ist, relativ zu der effektiven Größe der Makromoleküle äußerst groß. Die Messwerte der effektiven Größe der Moleküle oder der mittleren Weglänge bilden somit normalerweise keinen Aspekt von kritischer Wichtigkeit. Bevor dieser Aspekt kritisch würde, müsste das elektrophoretische Medium in Form einer extrem dünnen Membran vorliegen.

Ähnlich der Weise, in der die herkömmliche Anordnung, bei der eine Umkehrung der Polarität vorgesehen ist, mit dem Vibrieren eines Siebs gleichgesetzt werden könnte, lässt sich der gemäß der vorliegenden Erfindung konzipierte Vorgang mit einem zum Spaß betriebenen Wettkampf vergleichen. Verwendet man die Spass-Wettkampf-Analogie, so ähnelt die vorliegende Erfindung dem Trennen männlicher Läufer von weiblichen Läufern unter dem Wissen, dass männliche Läufer durchschnittlich schneller sind als weibliche Läufer. Eine große gemischte Gruppe aus männlichen und weiblichen Läufern wird an der Startlinie versammelt, wobei die Laufstrecke (d.h. vom Start zum Ende) dem gemäß der Erfindung vorgesehenen elektrophoretischen Medium analog ist. Dann wird der Lauf gestartet, wobei die männlichen und die weiblichen zur Ziellinie hin laufen. Es kann vorhergesagt werden, dass eine bestimmte Anzahl von männlichen Läufern den Spass-Wettkampf vor irgendeinem der weiblichen Läufer beenden werden. Der Spass-Wettkampf wird bewusst gestoppt, unmittelbar bevor irgendwelche weiblichen Läufer die Ziellinie kreuzen. Sämtliche Läufer, die die Ziellinie noch nicht gekreuzt haben, würden dann zurückgeschickt,

um einen weiteren Lauf zu starten. Die Spass-Wettkämpfe können dann wiederholt werden, bis ein gewünschter Anteil der männlichen Läufer von den weiblichen Läufern getrennt worden ist.

5

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

Im folgenden wird als Beispiel eine bevorzugte Form der Erfindung anhand der beigefügten Zeichnungen beschrieben.

10

Fig. 1 zeigen schematische Ansichten des gemäß der vorliegenden Erfindung vorgesehenen Vorgangs der elektrophoretischen Abscheidung während zweier verschiedener Stufen des Vorgangs;

15

Fig. 3 zeigt eine schematische Ansicht der gemäß der Erfindung vorgesehenen Vorrichtung zur elektrophoretischen Abscheidung.

Beste Art der Ausführung der Erfindung

20

Die in Fig. 3 gezeigte Vorrichtung 10 weist eine stromaufwärts angeordnete Puffer-Kammer 11 und eine stromabwärts angeordnete Puffer-Kammer 12 auf, die durch eine elektrophoretische Membran 13 getrennt sind. Die Kammern 11,12 weisen Außenwände 14 auf, die für Ionen-Lösungen durchlässig sind, jedoch nicht für Makromoleküle wie etwa Protein.

30

Außerhalb der stromaufwärtsigen und stromabwärtsigen Kammern 11,12 sind Elektroden 15,16 derart angeordnet, dass sie sich an gegenüberliegenden Seiten der Membran 13 befinden. Die Elektroden 15,16 werden verwendet, um ein elektrophoretisches Potenzial an die Membran 13 anzulegen.

Die erste Kammer 11 steht über Röhren 24,25 mit einem stromaufwärts angeordneten Reservoir 17 in Verbindung, so dass handelsübliche Mengen einer Mixtur, die verschiedene Spezies von Makromolekülen enthält, als erster Puffer-Strom zirkulierend an der Membran 13 vorbei geleitet werden kann. Die

5 Mixtur 3 enthält eine vorbestimmte Spezies 1 von Makromolekülen, die von der einen oder den mehreren anderen Spezies 2 von ähnlichen Transporteigenschaften aufweisenden Makromolekülen, die ebenfalls in der Mixtur 3 enthalten ist/sind, getrennt werden soll.

10 Die stromabwärtige Kammer 12 steht über Röhren 20,21 wahlweise entweder mit einem ersten stromabwärts angeordneten Reservoir 18 oder einem zweiten stromabwärts angeordneten Reservoir 19, die parallel angeordnet sind, in Verbindung. Das erste stromabwärtige Reservoir 18 wird zur Aufnahme von Puffer verwendet, der eine Spezies von Makromolekülen enthält, die von der

15 Mixtur abgeschieden worden ist, und das zweite stromabwärtige Reservoir 19 enthält eine frische aliquote oder Puffer-Lösung.

Die stromabwärtigen Reservoir 18,19 sind durch ein Paar von Steuerventilen 22,23 mit dem Röhren 20,21 verbunden, so dass eine (nicht gezeigte) Steuer-
20 einrichtung das eine oder das andere der Reservoir 18,19 in Fluidverbindung mit der stromabwärtigen Kammer 12 bringen kann.

Bei Betrieb ist die Mixtur 3, die die zwei oder mehr Spezies von Makromolekülen 12 enthält, zu denen eine bestimmte Spezies von Makromolekülen 1 zählt,
25 die von der Mixtur 3 abgeschieden werden soll, in dem stromaufwärtigen Reservoir 17 enthalten und wird als ein erster Puffer-Strom zirkulierend durch die Röhre 24, die stromaufwärtige Kammer 11 und durch die Röhre 25 zurück zu dem Reservoir 17 geleitet.

30 Die Membran 13 wird mit einer derart vorbestimmten Poren-Größe gewählt, dass sich die Spezies von Makromolekülen 1, die von der Mixtur 3 abgeschieden werden soll, mit einer schnelleren Rate durch die Membran 13 fortbewegt

als irgendein der anderen Spezies von Makromolekülen 2 in der Mixtur. Mittels der Elektroden 15,16 wird an die Membran 13 ein geeignetes elektrophoretisches Potenzial mit einer Anfangs-Polarität angelegt, die die Makromoleküle 1,2 veranlasst, aus der in der stromaufwärtigen Kammer 11 befindlichen Mixtur in die Membran 13 und zu der stromabwärtigen Kammer 12 zu wandern.

5 Die Anfangs-Polarität des elektrophoretischen Potenzials wird beibehalten, während sich die Spezies von Makromolekülen 1, die abgeschieden werden sollen, durch die Membran 13 hindurch bewegt und in die stromabwärtige Kammer 12 eintritt, und zwar so lange, wie im wesentlichen keines der anderen Spezies von Makromolekülen 2 in die stromabwärtige Kammer 12 eingetreten ist. In dieser Phase des Vorgangs wird das erste stromabwärtige Reservoir 18 in Verbindung mit der stromabwärtigen Kammer 12 gebracht, so dass die abgeschiedene Spezies von Makromolekülen 1 abgeschieden werden kann.

10 15 Zu einer ersten vorbestimmten Zeit, wenn die anderen Spezies von Makromolekülen 2 im Begriff sind, aus der Membran 13 heraus in die stromabwärtige Kammer 12 einzutreten, wird die Polarität des elektrophoretischen Potenzials umgekehrt, um sämtliche Makromoleküle 1,2 innerhalb der Membran 13 zu veranlassen, zurück zu der stromaufwärtigen Kammer 11 zu wandern. Die

20 25 umgekehrte Polarität des Potenzials wird für eine zweite vorbestimmte Zeit aufrechterhalten, bis im wesentlichen sämtliche Makromoleküle 1,2 aus der Membran 13 heraus zurück in die stromaufwärtige Kammer 12 gewandert sind, woraufhin die Anfangs-Polarität wiederhergestellt wird, um einen neuen Zyklus zu starten.

30 Während der mit umgekehrter Polarität erfolgenden Phase des Vorgangs wird da stromabwärtige Reservoir 19 mit der stromabwärtigen Kammer 12 verbunden, um ein frisches Aliquot von Puffer-Lösung in die stromabwärtige Puffer-Kammer 12 einzuführen. Auf diese Weise wird der Anteil der Spezies von Makromolekülen, die bereits aus der Membran 13 in den stromabwärtigen Lösungs-Strom eingetreten sind, aus der stromabwärtigen Kammer 12 heraus-

bewegt und durch das frische Pufferlösungs-Aliquot ersetzt. Dadurch wird generell verhindert, dass eines der Spezies von Makromolekülen, die bereits abgeschieden worden sind, zurück in die Membran 13 geführt werden.

- 5 Die Mixtur kann dem obigen Vorgang wiederholt unterzogen werden, wobei eine Reihe von Membranen 12 mit unterschiedlichen Poren-Größen verwendet werden kann und/oder der pH-Wert des Puffers derart verändert werden kann, dass unterschiedliche Spezies von Makromolekülen, die in der Mixtur enthalten sind, nacheinander abgeschieden werden. Beispielsweise können die Membranen 13 für jede nachfolgende Stufe des Abscheidungsvorgangs eine abnehmende Poren-Größe aufweisen, um einen diskontinuierlichen Poren-Gradienten zu schaffen.

Es ist erkennbar, dass die Wahl der Membran, des Puffers und der ersten und zweiten vorbestimmten Zeiten zum Anlegen und Umkehren des elektrophoretischen Potenzials zuerst durch Versuche bestimmt werden müssen, wobei z.B. gefärbte Marker verwendet werden. Nachdem die Membran und die Puffer-Lösung, die zum Abscheiden einer bestimmten Spezies von Makromolekülen aus einer bestimmten Mixtur am besten geeignet sind, gewählt worden sind, 15 und die Zeiten zum Anlegen des elektrophoretischen Potenzials bzw. zum Umkehren der Polarität des Potenzials für die gewählte Membran und den gewählten Puffer bestimmt worden sind, kann der Vorgang durch Einsatz geeigneter Steuereinrichtungen leicht automatisiert werden.

- 20 25 Ferner hat der Zyklus zum Anlegen und Umkehren des elektrophoretischen Potenzials einen vorteilhaften Nebeneffekt, indem er sämtliche Makromoleküle, die die Oberfläche der Membran 13 verschmutzen, "ausspült", wie in WO-A-8807406 beschrieben ist.

Beispiel

Die in Fig. 3 beschriebene Vorrichtung wurde für die Abscheidung gefärbten Lypsozym-Monomers (MW 14kD) von Dimer (28kD) und höheren Polymeren 5 von einer Mischung derselben verwendet. Bei dem in den ersten und zweiten Puffer-Kammern verwendeten Puffer handelte es sich um Tris-Borat-EDTA mit einer Konzentration von 50 mM, die einen gepufferten pH-wert von 8,3 ergab.

Das elektrophoretische Medium wies einen Stapel von vier Membranen auf, die 10 jeweils ein Molekulargewicht-Ausschluss von im wesentlichen 50 kD aufwiesen. Die Gesamtdicke betrug 0,4 mm. Der elektrophoretische Strom betrug 180 V, 0,4 A mit einem periodisch erfolgenden kurzen Umkehr-Impuls, um die Oberflächenverschmutzung der Membranen zu reduzieren.

15 Die Vorrichtung wurde mit einer Anfangs-Vorwärtspolarität drei Minuten lang betätigt, gefolgt von einer umgekehrten Polarität für sechs Minuten. Es erwies sich, dass sich in dem zweiten Puffer im wesentlichen reines Monomer ansammelte. Als die Anfangs-Vorwärtspolarität auf fünf Minuten verlängert wurde, wurde festgestellt, dass die zweite Puffer-Lösung Dimer enthielt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur elektrophoretischen Abscheidung mindestens einer Spezies von Makromolekülen aus einer Mixtur mit mindestens einer anderen Spezies von Makromolekülen durch Veranlassen einer elektrophoretischen Migration der mindestens einen Spezies von Makromolekülen aus einer ersten Elektrolytlösung zu einer zweiten Elektrolytlösung durch ein zwischen den Elektrolytlösungen angeordnetes elektrophoretisches Medium, wobei in dem Medium Durchgangswege ausgebildet sind, deren Querschnittsbemessung ein Hindurchtreten der mindestens zwei in der Mixtur befindlichen Spezies von Makromolekülen durch die Durchgangswege erlaubt und deren mittlere Weglänge eine Bewegung von Molekülen durch das Medium bewirkt, die relativ zu der in der Bewegungsrichtung mindestens einer der in der Mixtur befindlichen Spezies Makromoleküle gemessenen maximalen Bemessung sehr groß ist, mit den folgenden Schritten:
 - (a) Anlegen eines elektrophoretischen Potenzials an das elektrophoretische Medium, mit einer Anfangs-Polarität, mittels derer die Makromoleküle der Mixtur in das Medium getrieben werden, bis ein Anteil der mindestens einen Spezies von Makromolekülen aus dem Medium in die zweite Elektrolytlösung austritt und die andere Spezies von Makromolekülen über eine wesentliche Strecke durch das Medium hindurch vorgedrungen ist, jedoch bevor die mindestens eine andere Spezies von Makromolekülen in der genannten Weise ausgetreten ist;
 - (b) Umkehren der Polarität des elektrophoretischen Potenzials, so dass die in dem Medium befindlichen Makromoleküle zurück zu der ersten Elektrolytlösung hin getrieben werden, jedoch im wesentlichen verhindert wird, dass der Anteil der einen Spezies von Makromolekülen, der in die zweite Elektrolytlösung ausgetreten ist, zurück in das Medium gezogen wird; und
 - (c) Wiederholen des Anlegens und Umkehrens des elektrophoretischen Potenzials, bis ein gewünschter Anteil der mindestens einen Spezies

von Makromolekülen in die zweite Elektrolytlösung übertragen worden ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem Schritt b) des Umkehrens des elektrophoretischen Potenzials für eine Zeitdauer wiederholt wird, in der die andere Spezies von Makromolekülen im wesentlichen vollständig zurück in die erste Elektrolytlösung getrieben werden kann, bevor die Anfangs-Polarität des elektrophoretischen Potenzials wiederhergestellt wird und der Zyklus des Anlegens und Umkehrens der Polarität des elektrophoretischen Potenzials wiederholt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem der Anteil der einen Spezies von Makromolekülen, der in die Elektrolytlösung hinein ausgetreten ist, im wesentlichen daran gehindert wird, zurück in das Medium gezogen zu werden, indem vor dem Schritt des Umkehrens der Polarität des elektrophoretischen Potenzials selektiv die zweite Elektrolytlösung durch eine frische zweite Elektrolytlösung ersetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem der Anteil der einen Spezies von Makromolekülen, der in die zweite Elektrolytlösung hinein ausgetreten ist, während des Schritts des Anlegens der Anfangs-Polarität des elektrophoretischen Potenzials in ein erstes stromabwärts gelegenes Reservoir transportiert wird, und bei dem während des Schritts des Umkehrens der Polarität des elektrophoretischen Potenzials ein zweites stromabwärts gelegenes Reservoir die frische zweite Elektrolytlösung zuführt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der Schritt c) des Anlegens und Umkehrens des elektrophoretischen Potenzials wiederholt wird, bis mindestens 40 % der einen Spezies von Makromolekülen aus der ersten Elektrolytlösung entfernt und in der zweiten Elektrolytlösung gesammelt worden sind.

6. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die mittlere Weglänge des elektrophoretischen Mediums mindestens 10.000 mal so lang ist wie die effektive Größe mindestens einer der Spezies von Makromolekülen in der Mixturen.
7. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Elektrolytlösungen pH-Puffer sind.
8. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Zeitverhältnis zwischen der Anfangs- und der Umkehr-Polarität von 1:2 bis 1:4 beträgt.

1/2

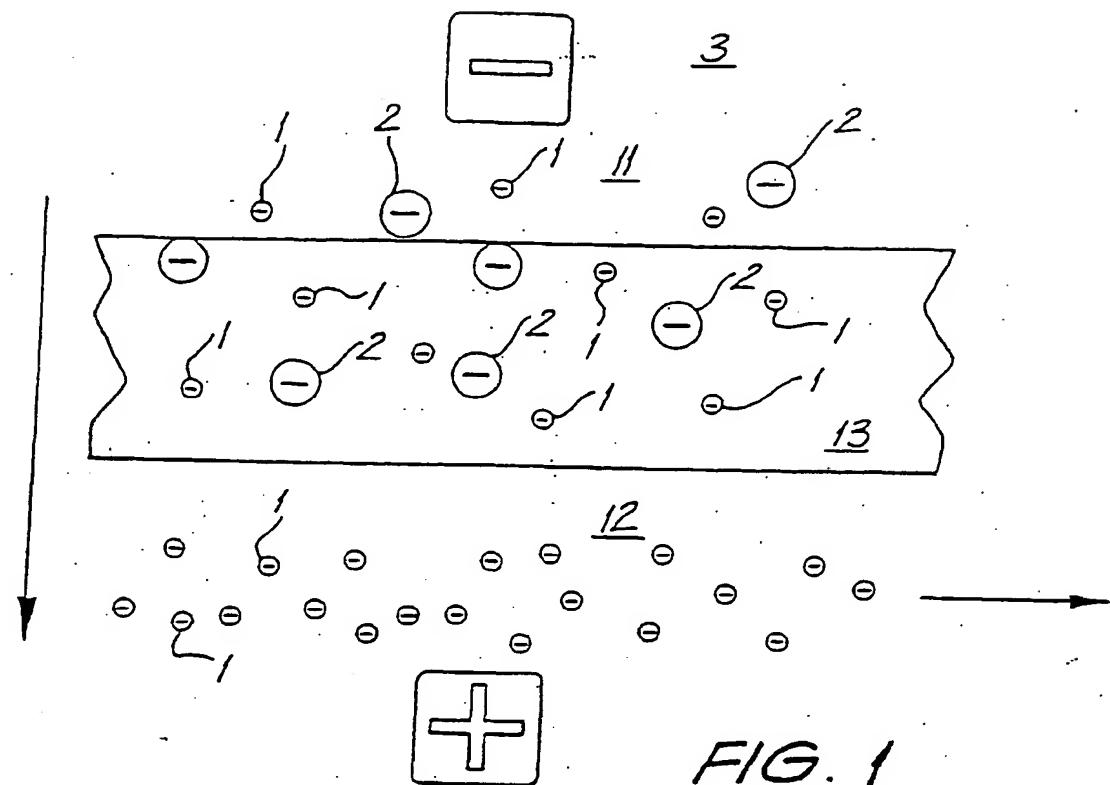


FIG. 1

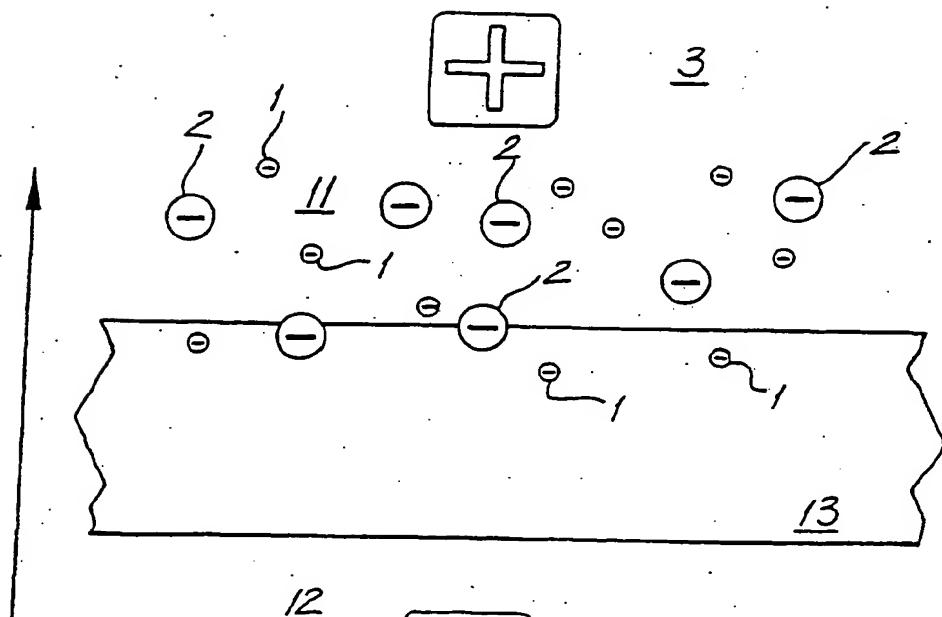


FIG. 2

12-07-01

212

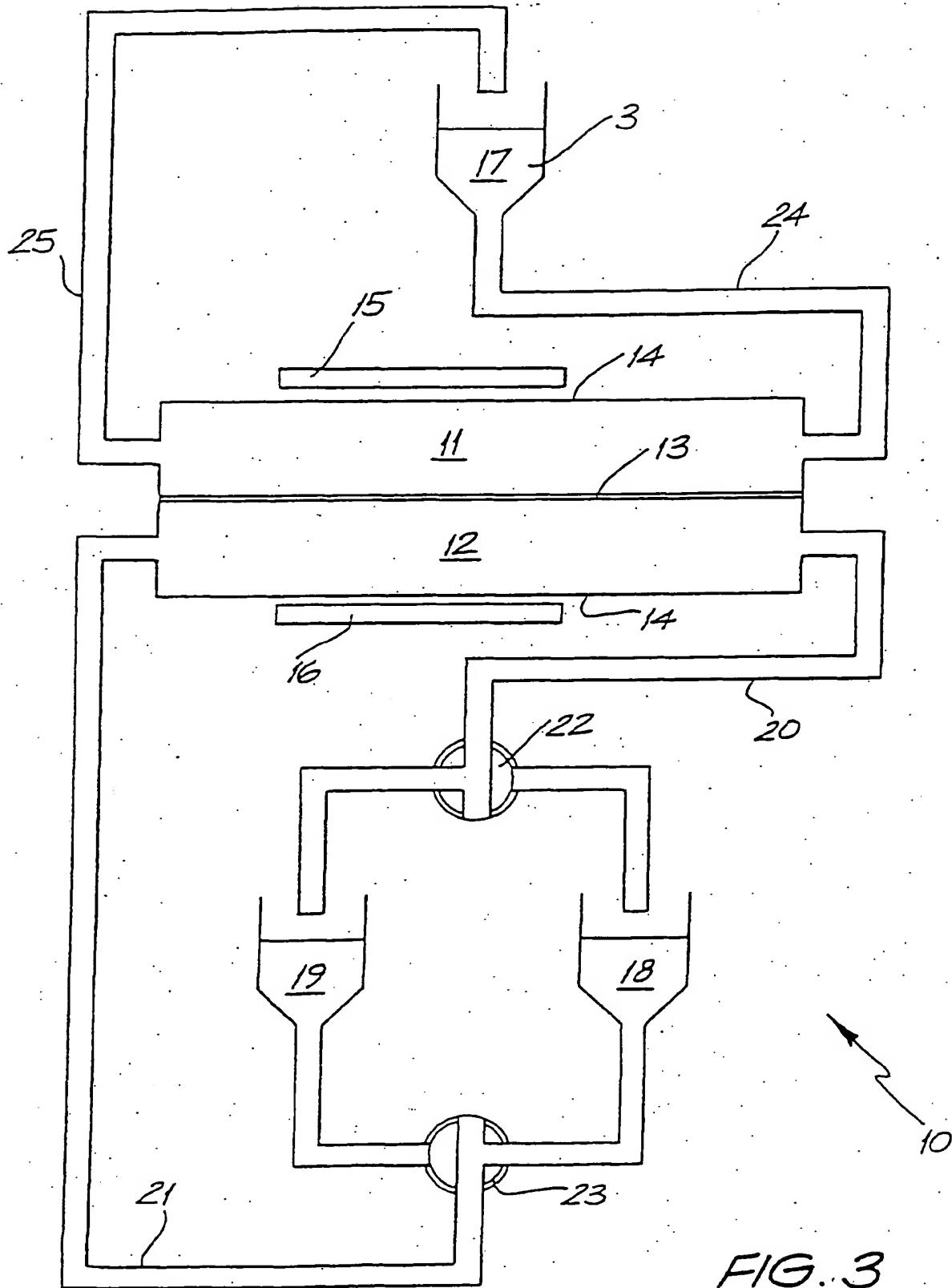


FIG. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)